

## 明 細 書

しみ部位亢進遺伝子群を指標とした皮膚しみ形成予知方法、皮膚しみ形成抑制剤のスクリーニング方法

## 技術分野

本発明は皮膚しみ形成を予知するための皮膚検査方法に関する。

## 背景技術

紫外線やホルモンのアンバランス、精神的ストレスなどによりメラノサイト（色素形成細胞）内の酵素チロシナーゼの働きが異常に活性化されると、メラニン色素が次々とつくりだされて周辺の表皮細胞に送られてしまう。メラニン色素のつくりだされるペースが速く、また紫外線等の影響でターンオーバーが正常でなくなると、メラニン色素が外へ排出されず、肌に残ってしまい、その結果肌にしみができてしまうものと考えられる。

しみができてしまったら、できるだけ早くその手入れをすることが好ましく、そのために美容技術者による視感(視覚)によるしみの官能評価や、皮膚状態の撮像装置、測色計等の機器を用いるしみの定量的評価により、しみの有無の早期判定が望まれる（特開2003-144393号公報）。

一旦しみができてしまうと、その除去は容易ではなく、肌の新陳代謝を良くして不要なメラニンを早く追い出し、余計なメラニンを作らないようにするなどの手入れが必要となる。従って、しみができる前に肌の手入れを行うことが好ましい。しかしながら、しみのでき易さには個体差があり、またその原因となる条件も様々であるため、しみができることを予知することは一般に困難である。よっ

BEST AVAILABLE COPY

て、しみができる前にしみができ易い状態であるか否かを予知できる手段があればしみ予防対策として極めて有効である。

## 発明の開示

本発明者は上記問題を鑑み、肌にしみができる前に肌がしみのでき易い状態であるか否かを予知できる手段を提供できるかを鋭意検討した。そして、本発明者は紫外線照射を施したのち照射をやめて日焼け様呈色が脱色した後、しばらくして老人性色素斑様のスポット状色素斑を形成するしみモデルマウス (M. Naganuma et al., Journal of Dermatological Science 25(2001) 29-35) のしみ部位及び非しみ部位の各々の表皮由来のRNAのマイクロアレイ解析の結果、紫外線を照射せず、スポット状色素斑の形成していない非しみ部位と比べ、しみ部位の表皮において下記の遺伝子の発現が特異的に亢進されていることを見出した。従って、ヒトの表皮において、下記の遺伝子の発現を調べることで、しみ形成し易い皮膚であると判断することが可能であることが明らかとなった。

### (1) AKO12157 遺伝子 (配列番号1)

遺伝子の塩基配列のみ既知であり、機能に関する報告はされていない遺伝子である (Meth. Enzymol. 303, 19-44 (1999))。ラットにおいてこの遺伝子と約80%相同な遺伝子 (S74257; 配列番号3) が癌の浸潤・転移に関係しているという報告は存在するが (Oncogene, 1994, 9 (12), 3591-3600)、この遺伝子についても皮膚色素関連の報告は存在しない。さらに、ヒトにおいてマウスAKO12157 遺伝子と約70%相同な遺伝子 (ヒトFLJ21763 遺伝子 (配列番号2)) の存在が知られているが、この遺伝子についても皮膚色素関連の報告は存在しない。

### (2) MCP-2 (Monocyte Chemoattracting Protein 2: 単球化

## 学誘引タンパク質-2)

ケモカイン（分子量約1万の小型のサイトカインファミリー）の一種であり、そのファミリーのMCP-1では単球の誘引を介して非腫瘍形成性のメラノーマ細胞を腫瘍形成させるという報告はあるが(Journal Immunol. Jun 1; 166(11):6483-6490)、皮膚色素関連の報告は存在しない。

(3) インターフェロンにより発現の亢進されることの知られる遺伝子群（以下、「遺伝子群1」と称する場合がある）

## a) ケモカイン系

Mcp9 (small inducible cytokine B subfamily (Cys-X-Cys), member 9) [Arthritis Rheum 2002 Oct; 46(10):2730-41];

Mcp10 (small inducible cytokine B subfamily (Cys-X-Cys), member 10) [J Immunol. 2002 Apr 1; 168(7):3195-204];

## b) シグナル伝達系

Isg15 (Interferon-stimulated protein (15kDa) isg15(Ubiquitin-like)) [Genes Dev 2003 Feb 15; 17(4):455-460];

Usp18 (ubiquitin specific protease 18) [J. Biol. Chem. 2002 Mar 22; 277(12):9976-9981]

## c) 抗ウィルス系

Oas12 (2'-5' oligoadenylate synthase-like OASL2 (IFN induced)) [J. Interferon Cytokine Res 2002 Sep; 22(9):981-993];

Gbp2 (IFN induced guanylate nucleotide binding protein 2 gbp2(antivirus)) [J. Interferon Cytokine Res 1998 Nov; 18(11):977-985];

Gtpi (GTPase; interferon-g induced GTPase(19440)) ;

I f i 4 7 (interferon gamma inducible protein, 47kDa (GTP-binding motif)) [J Immunol. 1992 May 15;148(10):3275-81];

I g t p (G T P a s e ; interferon gamma induced GTPase igtp)) [Infect Immun. 2002 Dec;70(12):6933-9];

T g t p (G T P a s e ; T-cell specific GTPase(IFN gamma)) J Leukoc Biol. 1995 Mar;57(3):477-83]

インターフェロンにより発現の亢進される遺伝子のプロモーター領域にはインターフェロン反応性エレメントが存在し、これにリン酸化により活性化された S T A T - 1 (signal transducers and activators of transcription)が結合することでこれら遺伝子の発現が亢進される (Free Radical Biology & Medicine 2000;28(9):1430-1437, Exp Dermatol 1999;8:96-108)。従って、上記遺伝子群 (1) はリン酸化されることで活性化されたリン酸化 S T A T - 1 の存在下で発現の亢進される遺伝子群であるともいえよう。そして実際図 6 に示すように、リン酸化 S T A T - 1 もしみ部位において高い発現をしていることを今回示している。

(4) 機能既知のその他の遺伝子群 (以下、「遺伝子群 2」と称する場合がある)

a) ケラチン系

S p r r 2 A (small proline-rich protein 2A) [Mamm. Genome 2003;14 (2): 140-148];

K r t 2 - 6 b (keratin complex 2, basic, gene 6a) [Genomics 1998; 53 (2):170-183]

b) セルサイクル系

C d k 5 r a p 2 (CKK5 regulatory subunit associated protein 2) [Neuron. 2003 Apr 10;38(1):33-46];

M e f 2 C (myocyte enhancer factor 2C) [Brain Res Mol Bra

in Res. 2001 Dec 16;97(1):70-82]

c)酸化還元系

G s t a 4 (glutathione S-transferase, alpha 4) [J. Biol. Chem. 2002 May 17; 277(20):17892-17900]

d)骨系

O s f 2 (osteoblast specific factor (fascilin I-like)) [Protein Expr Purif 1995 Jun; 6(39); 305-311]

e)細胞外マトリックス (E C M) 系

T n c (Tenascin C) [Matrix Biol 2000 Dec; 19(7):581-596]

f)インシュリン系

I g f b p 6 (insulin-like growth factor binding protein 6) [Mol. Cell. Endocrinol. 1994;104 (1): 57-66]

g)サイクロスポリン系

P p i c a p (peptidylprolyl isomerase C (cyclophylin C)-associated protein) [Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Jul 15;90 (14):6815-9]

M C P - 6 (Mast cell protease 6) [J. Biol. Chem. 1991 Feb 25; 266(6):3847-3853]。

(5) 機能未知の遺伝子群 (以下、「遺伝子群 3」と称する場合がある)

M m . 7 4 6 5 6 遺伝子 (GenBank Acc:AA519023)

上記遺伝子群 (3) のいずれも、皮膚色素関連の報告は存在しない。従って、しみとの関係でこれら遺伝子の発現が亢進されることは極めて驚くべき事実である。

第一の観点において、本発明は皮膚しみ形成を予知するための皮膚検査方法を提供する。この方法は、表皮中の M C P 2 の発現が正常な表皮中の発現に比べて亢進している場合、しみ形成し易い皮膚

であると判断することを特徴とする。

好適な態様において、上記皮膚しみ形成はUVB照射を原因とするものである。

さらに好適な態様において、上記表皮中のMCP2の発現の亢進は、表皮中のMCP2の量を測定することにより決定される。

さらに好適な態様において、上記測定はMCP2に特異的な抗体を利用するELISA法又はRIA法による。

さらに好適な態様において、上記表皮中のMCP2の発現の亢進は、表皮から抽出されたMCP2をコードするmRNAの量を測定することにより決定される。

さらに好適な態様において、上記mRNAの測定はポリメラーゼ連鎖反応法により行う。

第二の観点において、本発明は皮膚しみ形成抑制因子及び／又は皮膚しみ除去因子をスクリーニングする方法を提供する。この方法は、候補化合物をMCP2の発現及び／又は活性を阻害する能力について評価し、当該阻害能力を有するMCP2インヒビターを皮膚しみ形成抑制因子及び／又は皮膚しみ除去因子として選定することを特徴とする。

好適な態様において、この方法はさらに、上記阻害能力を有するMCP2インヒビターをしみ形成モデル動物に適用し、皮膚しみ形成抑制及び／又は皮膚しみ除去効果を有するインヒビターを選定することを含んで成る。

第三の観点において、本発明は別の皮膚しみ形成を予知するための皮膚検査方法を提供する。この方法は、表皮中の配列番号2に示す塩基配列から成るポリヌクレオチド（ヒトFLJ21763遺伝子）もしくはその中の少なくとも50、好ましくは少なくとも100、より好ましくは少なくとも200、特に好ましくは少なくとも

400個の連続ヌクレオチドの配列から成るポリヌクレオチドの発現、又は表皮中の配列番号2に示す塩基配列から成るポリヌクレオチド（ヒトFLJ21763遺伝子）、配列番号1に示す塩基配列から成るポリヌクレオチド（マウスAK012157遺伝子）もしくは配列番号3に示す塩基配列から成るポリヌクレオチド（ラットS74257遺伝子）もしくはそれらの中の少なくとも50、好ましくは少なくとも100、より好ましくは少なくとも200、特に好ましくは少なくとも400個の連続ヌクレオチドの配列から成るポリヌクレオチドに対し高ストリンジेंट条件下でハイブリダイゼーション可能なポリヌクレオチドの発現が正常な表皮中の発現に比べて亢進している場合、しみ形成のし易い皮膚であると判断することを特徴とする。ヒトFLJ21763遺伝子及びラットS74257遺伝子はマウスAK012157遺伝子に対し高い相同性を示す遺伝子である（それぞれ約70%及び約80%）。マウスAK012157遺伝子、ヒトFLJ21763遺伝子及びラットS74257遺伝子の対比を図1～2に示す。ハイブリダイゼーションは周知の方法又はそれに準じる方法、例えばJ. SambrookらMolecular Cloning 2nd, Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989に記載の方法に従って行うことができ、そして高ストリンジेंटなハイブリダイゼーション条件とは、例えばナトリウム濃度が約10～40 mM、好ましくは約20 mM、温度が約50～70℃、好ましくは約60～65℃であることを含む条件をいう。

好適な態様において、上記皮膚しみ形成はUVB照射を原因とする。

さらに好適な態様において、上記表皮中の前記ポリヌクレオチドの発現の亢進は、表皮から抽出された前記当該ポリヌクレオチドに相補性のmRNAの量を測定することにより決定される。

さらに好適な態様において、上記mRNAの測定はポリメラーゼ連鎖反応法により行う。

第四の観点において、本発明は別の皮膚しみ形成抑制因子及び／又は皮膚しみ除去因子をスクリーニングする方法を提供する。この方法は、候補化合物を表皮中の配列番号2に示す塩基配列から成るポリヌクレオチド（ヒトFLJ21763遺伝子）もしくはその中の少なくとも50、好ましくは少なくとも100、より好ましくは少なくとも200、特に好ましくは少なくとも400個の連続ヌクレオチドの配列から成るポリヌクレオチドの発現、又は表皮中の配列番号2に示す塩基配列から成るポリヌクレオチド（ヒトFLJ21763遺伝子）、配列番号1に示す塩基配列から成るポリヌクレオチド（マウスAK012157遺伝子）もしくは配列番号3に示す塩基配列から成るポリヌクレオチド（ラットS74257遺伝子）もしくはそれらの中の少なくとも50、好ましくは少なくとも100、より好ましくは少なくとも200、特に好ましくは少なくとも400個の連続ヌクレオチドの配列から成るポリヌクレオチドに対し高ストリンジェント条件下でハイブリダイゼーション可能なポリヌクレオチドの発現を阻害する能力について評価し、当該阻害能力を有するインヒビターを皮膚しみ形成抑制因子及び／又は皮膚しみ除去因子として選定することを特徴とする。

好適な態様において、この方法は更に、上記阻害能力を有する前記インヒビターをしみ形成モデル動物に適用し、皮膚しみ形成抑制及び／又は皮膚しみ除去効果を有するインヒビターを選定することを含んで成る。

第五の観点において、本発明は更なる別の皮膚しみ形成を予知するための皮膚検査方法を提供する。この方法は、リン酸化STAT-1 (signal transducers and activators of transcription) 及



びインターフェロンの存在下で発現の亢進される表皮中の遺伝子の発現が正常な表皮中の発現に比べて亢進している場合、しみ形成し易い皮膚であると判断することを特徴とする。ここで、しみとは、皮膚に現われる茶褐色ないし濃褐色の平面状斑紋をいう（広辞苑）。なかでも今回のシミモデルマウスについて表記するしみは、主に老人性色素斑様の色素斑をさす。

好適な態様において、リン酸化 S T A T - 1 及びインターフェロンの存在下で発現の亢進される表皮中の遺伝子は M c p 9、M c p 10、I s g 15、U s p 18、O a s 12、G b p 2、G t p i、I f i 47、I g t p 及び T g t p から成る群から選ばれるタンパク質をコードする遺伝子である。

第六の観点において、本発明は更なる別の皮膚しみ形成を予知するための皮膚検査方法であって、S p r r 2 A、K r t 2 - 6 b、C d k 5 r a p 2、M e f 2 C、G s t a 4、O s f 2、T n c、I g f b p 6 及び P p i c a p から成る群から選ばれるタンパク質をコードする遺伝子の発現が正常な表皮中の発現に比べて亢進している場合、しみ形成し易い皮膚であると判断することを特徴とする方法を提供する。

第七の観点において、本発明は更なる別の皮膚しみ形成を予知するための皮膚検査方法であって、M C P - 6 (Mast cell protease 6) タンパク質の発現が正常な表皮中の発現に比べて亢進している場合、しみ形成し易い皮膚であると判断することを特徴とする方法を提供する。

好適には、上記皮膚しみ形成は U V B 照射を原因とする。

好適な態様において、上記表皮中の遺伝子の発現の亢進は、表皮中の前記タンパク質の量を測定することにより決定される。

さらに好適には、上記測定は上記タンパク質に特異的な抗体を利

用するELISA法又はRIA法により行われる。

別の好適な態様において、上記表皮中の前記遺伝子の発現の亢進は、表皮から抽出された前記タンパク質をコードするmRNAの量を測定することにより決定される。好ましくは、上記mRNAの測定はポリメラーゼ連鎖反応法により行われる。

第八の観点において、本発明は更なる別の皮膚しみ形成抑制因子及び／又は皮膚しみ除去因子をスクリーニングする方法であって、候補化合物を上記遺伝子の発現及び／又はその遺伝子産物たるタンパク質の活性を阻害する能力について評価し、当該阻害能力を有するインヒビターを皮膚しみ形成抑制因子及び／又は皮膚しみ除去因子として選定することを特徴とする方法を提供する。

好適な態様において、この方法は更なる別の上記阻害能力を有するインヒビターをしみ形成モデル動物に適用し、皮膚しみ形成抑制及び／又は皮膚しみ除去効果を有するインヒビターを選定することを含んで成る。

第九の観点において、本発明はさらばる別の皮膚しみ形成を予知するための皮膚検査方法であって、表皮中の配列番号1に示す塩基配列から成るポリヌクレオチド(Mm. 7 4 6 5 6)に対し高ストリンジェント条件下でハイブリダイゼーション可能なポリヌクレオチドの発現が正常な表皮中の発現に比べて亢進している場合、しみ形成のし易い皮膚であると判断することを特徴とする方法を提供する。

好適には、上記皮膚しみ形成はUVB照射を原因とする。

好適な態様において、上記表皮中の前記ポリヌクレオチドの発現の亢進は、表皮から抽出された前記当該ポリヌクレオチドに相補性のmRNAの量を測定することにより決定される。

好適には、上記mRNAの測定はポリメラーゼ連鎖反応法により行わ

れる。

第十の観点において、本発明は更なる別の皮膚しみ形成抑制因子及び／又は皮膚しみ除去因子をスクリーニングする方法であって、候補化合物を表皮中の配列番号 1 に示す塩基配列から成るポリヌクレオチド (Mm. 7 4 6 5 6) に対し高ストリンジェント条件下でハイブリダイゼーション可能なポリヌクレオチドの発現を阻害する能力について評価し、当該阻害能力を有するインヒビターを皮膚しみ形成抑制因子及び／又は皮膚しみ除去因子として選定することを特徴とする方法を提供する。ハイブリダイゼーションは周知の方法又はそれに準じる方法、例えば J. Sambrook ら Molecular Cloning 2nd; Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989 に記載の方法に従って行うことができ、そして高ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件とは、例えばナトリウム濃度が約 10 ～ 40 mM、好ましくは約 20 mM、温度が約 50 ～ 70℃、好ましくは約 60 ～ 65℃であることを含む条件をいう。

本発明により、皮膚しみ形成を予知するための皮膚検査方法提供が可能となる。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、マウス AK012157 遺伝子、ヒト FLJ21763 遺伝子及びラット S74257 遺伝子の対比。

図 2 は、図 1 の続きである。

図 3 は、PCR による、しみモデルマウスの表皮及び真皮における AK012157 遺伝子及び MCP-2 遺伝子の発現を示す。

図 4 は、in situ ハイブリダイゼーションによる、しみモデルマウスの表皮における AK012157 遺伝子の発現を示す。

図 5 は、免疫組織染色による、しみモデルマウスの表皮における

M C P - 2 の発現を示す。

図 6 は、ウェスタンブロットによる主要なシグナルタンパクのシミ部位と正常部位での発現差を示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

上述の通り、マウス A K 0 1 2 1 5 7 遺伝子、この遺伝子に対し高い相同性を示すラット S 7 4 2 5 7 遺伝子やヒト F L J 2 1 7 6 3 遺伝子、さらには上記遺伝子群 (1) から (3) に関し皮膚色素関連の報告は存在しない。また、マウス及びヒト M C P - 2 も皮膚色素関連の報告は存在しない。本発明者は紫外線照射を施したしみモデルマウスのしみ部位及び非しみ部位の各々の表皮由来の R N A のマイクロアレイ解析の結果、非しみ部位と比べ、しみ部位の表皮において A K 0 1 2 1 5 7 遺伝子、M C P - 2 遺伝子及び上記遺伝子群 (1) から (3) の遺伝子の発現が特異的に亢進されていることを見出した。従って、これら遺伝子を遺伝子を指標とすることで、皮膚しみ形成を予知することができるものと推認できる。特に、A K 0 1 2 1 5 7 遺伝子、M C P - 2 遺伝子の発現の亢進はしみモデルマウスにおいて UV 照射期にとどまらず、UV 照射を終えた後に UV 照射による表皮の褐色が脱色し始める脱色期、更にはその後しみが出現し始め、しみが形成される色素斑形成期においても認められた。しみモデルマウスの表皮においてこれらの遺伝子の発現が脱色期においても亢進していることから、ヒトにおいても、これら遺伝子と相同な遺伝子を指標とすれば、しみが形成される前の脱色期においても将来しみが形成されることを予知できることとなる。

#### しみモデルマウス

しみモデルマウスは M. Naganuma et al., 前掲に記載の通りにして作製することができる。簡単には、例えば 7 週齢前後のマウスに

紫外光源(Toshiba FL-SE; UVB)の下で約8週にわたり週約3回、99mJ/cm<sup>2</sup>程度の強度で紫外線照射する(UV照射期)。かかるUV照射期の間、皮膚の均一な色素沈着(皮膚の褐色化)が認められるようになる。この色素沈着はUV照射を止めてから2週間程度でほぼ完全に消失する(脱色期)。その後、直径約2mm以下の小さい、薄茶色の色素斑(いわゆる老人性色素斑様の「しみ」)が出現しはじめる(色素斑出現及び形成期)。

#### 皮膚しみ形成を予知するための皮膚検査方法

本発明は、皮膚、好ましくはヒト皮膚しみ形成を予知するための皮膚検査方法を提供する。この方法は、表皮中のMCP-2遺伝子もしくはヒトFLJ21763遺伝子、又はヒトFLJ21763遺伝子、マウスAK012157遺伝子もしくはラットS74257遺伝子に対し高ストリンジェント条件下でハイブリダイゼーション可能なポリヌクレオチド、あるいは表皮中のMcp9、Mcp10、Isg15、Usp18、Oas12、Gbp2、Gtpi、Ifi47、Igt p、Tgt p、Sprr2A、Krt2-6b、Cdk5rap2、Mef2C、Gsta4、Osf2、Tnc、Igf-bp6及びPpicapから成る群から選ばれる遺伝子の発現が正常な表皮中の発現に比べて亢進している場合、しみ形成のし易い皮膚であると判断することの特徴とする。その評価基準として、例えば表皮中のMCP-2遺伝子もしくはヒトFLJ21763遺伝子、又はヒトFLJ21763遺伝子、マウスAK012157遺伝子もしくはラットS74257遺伝子に対し高ストリンジェント条件下でハイブリダイゼーション可能なポリヌクレオチド、あるいは表皮中のMcp9、Mcp10、Isg15、Usp18、Oas12、Gbp2、Gtpi、Ifi47、Igt p、Tgt p、Sprr2A、Krt2-6b、Cdk5rap2、Mef

2 C、G s t a 4、O s f 2、T n c、I g f b p 6 及び P p i c a p から成る群から選ばれる遺伝子の発現がコントロール表皮中のそれらと比べ10%以上、又は20%以上、又は30%以上、又は50%以上、又は70%以上、又は100%以上亢進していたなら「しみ形成のし易い皮膚である」と判断する、としてよい。検査すべき皮膚は、例えば顔、首、腕、肢など、しみができやすく、またしみ形成の気になるあらゆる部分の表皮であってよい。しみ形成のしない正常表皮、即ちコントロール表皮としては、例えば同一個体の例えば紫外線に曝されにくく、比較的しみのできにくい部位の表皮、例えば腹部、臀部の表皮であってよい。

本発明は、また皮膚、好ましくはヒト皮膚しみ形成を予知するための皮膚検査方法であって、表皮中のM C P - 6 又はM m . 7 4 6 5 6 遺伝子に対し高ストリンジェント条件下でハイブリダイゼーション可能なポリヌクレオチドの発現が正常な表皮中の発現に比べて亢進している場合、しみ形成のし易い皮膚であると判断することを特徴とする方法を提供する。その評価基準として、例えば表皮中の上記ポリヌクレオチドの発現がコントロール表皮中のそれらと比べ10%以上、又は20%以上、又は30%以上、又は50%以上、又は70%以上、又は100%以上亢進していたなら「しみ形成のし易い皮膚である」と判断する、としてよい。

ハイブリダイゼーションは周知の方法又はそれに準じる方法、例えばJ.SambrookらMolecular Cloning 2nd, Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989に記載の方法に従って行うことができ、そして高ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件とは、例えばナトリウム濃度が約10~40mM、好ましくは約20mM、温度が約50~70℃、好ましくは約60~65℃であることを含む条件をいう。

表皮中の上記遺伝子の亢進は、例えば表皮中の当該遺伝子によりコードされるタンパク質の量を測定することにより決定される。例えば、表皮中のMCP-2発現の亢進は、例えば表皮中のMCP-2の量を測定することにより決定される。好ましくは、この測定は上記タンパク質に特異的な抗体を利用し、当業界において周知の方法、例えば蛍光物質、色素、酵素等を利用する免疫染色法、ウェスタンブロット法、免疫測定方法、例えばELISA法、RIA法等、様々な方法により実施できる。また、表皮からRNAを抽出し、当該遺伝子をコードするmRNAの量を測定することにより決定することもできる。mRNAの抽出、その量の測定も当業界において周知であり、例えばRNAの定量は定量ポリメラーゼ連鎖反応法（PCR）により行われる。

表皮中の上記遺伝子に対し高ストリンジェント条件下でハイブリダイゼーション可能なポリヌクレオチドの発現は、表皮からRNAを抽出し、上記ポリヌクレオチドに対応するmRNAの量を測定することにより決定することもできる。例えば、表皮中のヒトFLJ21763遺伝子、又はヒトFLJ21763遺伝子、マウスAKO12157遺伝子もしくはラットS74257遺伝子に対し高ストリンジェント条件下でハイブリダイゼーション可能なポリヌクレオチドの発現は、表皮からRNAを抽出し、上記ポリヌクレオチドに対応するmRNAの量を測定することにより決定することもできる。mRNAの抽出、その量の測定も当業界において周知であり、例えばRNAの定量は定量ポリメラーゼ連鎖反応法（PCR）により行われる。

上述の通り、本発明は、紫外線照射を施したしみモデルマウスのしみ部位及び非しみ部位の各々の表皮由来のRNAのマイクロアレイ解析の結果、非しみ部位と比べ、しみ部位の表皮においてAKO12157遺伝子、MCP-2遺伝子、遺伝子群（1）から（3）

の遺伝子の発現が特異的に亢進されていることを見出したことに基づく。従って、表皮中の上記遺伝子の発現及び／もしくはその遺伝子産物たる上記タンパク質の活性を抑える、例えば表皮中のMCP-2遺伝子の発現及び／もしくはMCP-2の活性を抑える、表皮中のヒトFLJ21763遺伝子の発現を抑える、又はヒトFLJ21763遺伝子、マウスAK012157遺伝子もしくはラットS74257遺伝子に対し高ストリンジェント条件下でハイブリダイゼーション可能なポリヌクレオチドの発現を抑えることを指標とした皮膚のしみ形成を抑える及び／又は形成されたしみを除去する薬剤を開発することができるものと推認される。

従って、本発明は上記遺伝子の発現を阻害するインヒビターを皮膚しみ形成抑制因子及び／又は皮膚しみ除去因子として含んで成る医薬又は皮膚外用組成物を提供する。本発明に係る組成物は皮膚のしみ形成を予防又はしみを除去することができる。

MCP-2の活性を阻害するインヒビターとしては、例えば特表2001-518296号公報に記載されている天然MCP-2のアミノ酸1、1～2、1～3、1～4又は1～5に相当するNH<sub>2</sub>-末端アミノ酸を欠き、ケモカインアンタゴニスト活性を有するアミノ末端切除型MCP-2が挙げられる。

また、MCP-2のインヒビターには、MCP-2が結合することで知られるCCR-1、3又は5レセプターのアンタゴニストが含まれる。CCR-3レセプターのアンタゴニストは例えば特開平11-14782号公報、特表2002-512957号公報、特表2002-512960号公報、特表2002-530374号公報、特表2002-512957号公報、2003-510248号公報に記載されている。その具体例としては、例えば、

N- { 1 - (S) - [ 4 - (3, 4-ジクロロベンジル) ピペラ



ジン-1-イルメチル}-2-メチルプロピル}-4-メチルベンズアミド二塩酸塩；

N-{1-(S)-[4-(3,4-ジクロロベンジル)ピペラジン-1-イルメチル]-2,2-ジメチルプロピル}-4-メチルベンズアミド二塩酸塩；

N-{1-(S)-[4-(3,4-ジクロロベンジル)ピペリジン-1-イルメチル]-2-メチルプロピル}-4-メチルベンズアミド二塩酸塩；

N-{1-(R)-[4-(3,4-ジクロロベンジル)ピペリジン-1-イルメチル]-2-メチルプロピル}-4-(2-アミノエチル)ベンズアミド二塩酸塩；

N-{1-(R)-[4-(3,4-ジクロロベンジル)ピペリジン-1-イルメチル]-2-メチルプロピル}-5-メチルチオフエン-2-カルボキサミド塩酸塩；

1-{1-(R)-[4-(3,4-ジクロロベンジル)ピペラジン-1-イルメチル]-2-メチルプロピル}-3-(3-メトキシフェニル)尿素；

1-{1-(R)-[4-(3,4-ジクロロベンジル)ピペリジン-1-イルメチル]-2-メチルプロピル}-3-(3-メトキシフェニル)尿素；

(S)-エチル-2-(4-メチルベンゼンスルホニルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート；

(S)-エチル-2-(5-ジメチルアミノナフタレン-1-スルホニルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート；

(S)-エチル-2-(ナフタレン-2-スルホニルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート；(S)-エチル-2-(チオフエン-2-スルホニルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネー

ト；

(S)-エチル-2-(キノリン-8-スルホニルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート；

(S)-エチル-2-(2,4,6-トリメチルベンゼンスルホニルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート；

(S)-エチル-2-(4-ブロモベンゼンスルホニルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート；

(S)-エチル-2-(4-クロロベンゼンスルホニルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート；

(S)-エチル-2-(4-メトキシベンゼンスルホニルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート；

(S)-エチル-2-メタンスルホニルアミノ-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート；

(S)-エチル-2-[2-(E)-スチリルスルホニルアミノ]-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート；

(S)-エチル-2-(3-トリフルオロメチルベンゼンスルホニルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート；

(S)-エチル-2-(2,5-ジクロロチオフェン-3-スルホニルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート；

(S)-エチル-2-(2-ブロモベンゼンスルホニルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート；

(S)-エチル-2-[5-(2-ピリジル)チオフェン-2-スルホニルアミノ]-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート；

(S)-エチル-2-(1,3-ジメチル-5-クロロ-2-ピラゾリン-4-スルホニルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート；

(S)-エチル-2-(4-ピフェニルスルホニルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート；

(S)-エチル-2-(2-ニトロ-4-メトキシベンゼンスルホニルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート；

(S)-エチル-2-(2,5-ジクロロベンゼンスルホニルアミノ)-3-[4-(2,5-ジクロロベンゼンスルホニルオキシ)フェニル]プロピオネート；

(S)-エチル-2-(2,4-ジフルオロベンゼンスルホニルアミノ)-3-[4-(2,4-ジフルオロベンゼンスルホニルオキシフェニル)]プロピオネート；

(S)-エチル-2-(5-ジメチルアミノナフタレン-1-スルホニルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート；

(S)-エチル-2-(チオフエン-2-スルホニルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート；

(S)-エチル-2-(2,4,6-トリメチルベンゼンスルホニルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート；

(S)-エチル-2-(4-ブromoベンゼンスルホニルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート；

(S)-エチル-2-(4-クロロベンゼンスルホニルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート；

(S)-エチル-2-(4-メトキシベンゼンスルホニルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート；

(S)-エチル-2-[2-(E)-スチリルスルホニルアミノ]-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート；

(S)-エチル-2-(3-トリフルオロメチルベンゼンスルホニルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート；

(S)-エチル-2-(2,5-ジクロロチオフエン-3-スルホニルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート；

(S)-エチル-2-(2-ブromoベンゼンスルホニルアミノ)-3-(4-

ヒドロキシフェニル)プロピオネート ;

(S)-エチル-2-[5-(2-ピリジル)チオフエン-2-スルホニルアミノ]-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート ;

(S)-エチル-2-(2-ニトロ-4-メトキシベンゼンスルホニルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート ;

(S)-エチル-2-(2,5-ジクロロベンゼンスルホニルアミノ)-3-[4-(2,5-ジクロロベンゼンスルホニルオキシ)フェニル]プロピオネート ;

(S)-エチル-2-(2,5-ジクロロチオフエン-3-スルホニルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート ;

(S)-エチル-2-(2-ブromoベンゼンスルホニルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート ;

(S)-エチル-2-(2,5-ジクロロベンゼンスルホニルアミノ)-3-[4-(2,5-ジクロロベンゼンスルホニルオキシ)フェニル]プロピオネート ;

(S)-エチル-2-(1-ナフトイルアミノ)-3-(4-ニトロフェニル)プロピオネート ;

(S)-イソプロピル-2-(1-ナフトイルアミノ)-3-(4-ニトロフェニル)プロピオネート ;

(S)-メチル-2-(1-ナフトイルアミノ)-3-(4-ニトロフェニル)プロピオネート ;

(S)-ベンジル-2-(1-ナフトイルアミノ)-3-(4-ニトロフェニル)プロピオネート ;

(S)-エチル-2-(1-ナフトイルアミノ)-3-(4-クロロフェニル)プロピオネート ;

(S)-エチル-2-ベンゾイルアミノ-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート ;

(S,S)-エチル-2-(2-ベンジルオキシカルボニルアミノ-3-フェニルプロピオニルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート；

(S,S)-エチル-2-(N-アセチルピロリジン-2-ベンゾイルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート；

(S)-エチル-2-シクロヘキサニルアミノ-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート；

(S)-エチル-2-(3,3-ジフェニルプロピオニルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート；

(S)-エチル-2-(3-フェニルプロピオニルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート；

(S)-エチル-2-[2-(2-ナフチル)アセチルアミノ]-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート；

(S)-エチル-2-(4-フェニルブチリルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート；

(S)-エチル-2-ペンタニルアミノ-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート；

(S)-エチル-2-ペンタニルアミノ-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート；

(S)-エチル-2-(4-ベンゾイルベンゾイルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート；

(S)-エチル-2-(2-フラニル)アミノ-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート；

(S)-エチル-2-(1-ナフトイルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート；

(S)-エチル-2-(5-ヒドロキシインドニル)アミノ-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート；

(S)-エチル-2-ピペロニルアミノ-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート；

(S)-エチル-2-ピコリニルアミノ-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート；

(S)-エチル-2-(3-ニトロ-4-クロロベンゾイルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート；

(S)-エチル-2-(3-ヒドロキシ-4-ニトロベンゾイルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート；

(S)-エチル-2-(8-キノリニルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート；

(S)-エチル-2-ベンゾイルアミノ-3-フェニルプロピオネート；

(S)-メチル-2-ベンゾイルアミノ-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート；

(S)-ベンジル-2-ベンゾイルアミノ-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート；

(S)-エチル-2-ベンゾイルアミノ-3-(4-メトキシフェニル)プロピオネート；

(S)-エチル-2-tert-ブチルオキシカルボニルアミノ-3-(4-ニトロフェニル)プロピオネート；

(S)-エチル-2-tert-ブチルオキシカルボニルアミノ-3-(4-アミノフェニル)プロピオネート；

(S)-エチル-2-ベンゾイルアミノ-3-(3,5-ジヨード-4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート；

(S)-エチル-2-カルボキシベンゾイルアミノ-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート；

(S)-エチル-2-ベンゾイルアミノ-3-(1-ナフチル)プロピオネ

ート；

(±)-エチル-2-ベンゾリルアミノ-3-[3-(ベンゾイルオキシ)フェニル]プロピオネート；

(±)-エチル-2-ベンゾイルアミノ-3-(3-ヒドロキシフェニル)プロピオネート；

(R,S)-エチル-2-ベンゾイルアミノ-3-(2-ヒドロキシルフェニル)プロピオネート；

(S)-エチル-2-ベンゾイルアミノ-3-(4-アミノフェニル)プロピオネート；

(S)-エチル-2-ベンゾイルアミノ-3-(4-ニトロフェニル)プロピオネート；

(S)-エチル-2-(2-フェニルアセチルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート；

(S)-エチル-2-ベンゾイルアミノ-3-(3-インドイル)プロピオネート；

(±)-エチル-2-(ベンゾイルアミノ)-2-フェニルアセタート；

(±)-エチル-2-(ベンゾイルアミノ)-4-フェニルブチラート；

(S)-エチル-2-(1-ナフトイルアミノ)-3-(4-ニトロフェニル)プロピオネート；

(S)-エチル-2-ベンゾイルアミノ-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート；

(S)-エチル-2-シクロヘキサニルアミノ-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート；

(S)-エチル-2-(1-ナフトイルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート；

(S)-ベンジル-2-ベンゾイルアミノ-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート；

(S)-エチル-2-ベンゾイルアミノ-3-(4-メトキシフェニル)プロピオネート；

(S)-エチル-2-ベンゾイルアミノ-3-(1-ナフチル)プロピオネート；

(±)-エチル-2-ベンゾリルアミノ-3-[3-(ベンゾイルオキシ)フェニル]プロピオネート；

(±)-エチル-2-ベンゾイルアミノ-3-(3-ヒドロキシフェニル)プロピオネート；

(R,S)-エチル-2-ベンゾイルアミノ-3-(2-ヒドロキシルフェニル)プロピオネート；

(S)-エチル-2-ベンゾイルアミノ-3-(4-ニトロフェニル)プロピオネート；

(±)-エチル-2-(ベンゾイルアミノ)-2-フェニルアセタート；

(±)-エチル-2-(ベンゾイルアミノ)-4-フェニルブチラート；

(S)-エチル-2-(1-ナフトイルアミノ)-3-(4-ニトロフェニル)プロピオネート；

(S)-エチル-2-(1-ナフトイルアミノ)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネート；

(S)-エチル-2-ベンゾイルアミノ-3-(4-ニトロフェニル)プロピオネートが挙げられる。

CCR-1レセプターのアнтаゴニストには、例えば特許出願公開WO97/24325；Pfizer, Inc. によるWO98/38167；帝人（株）によるWO97/44329；萬有製薬（株）によるWO98/04554；Merck & Co., Inc. によるWO98/27815、WO98/25604、WO98/25605、WO98/25617及びWO98/31364；LeukoSite, Inc. によるWO98/02151及び同



WO 99/37617; LeukoSite, Inc. らによる WO 99/37651 及び WO 99/37619; 米国特許仮出願第 60/021, 716 号明細書 (1996 年 7 月 12 日出願); 米国特許出願第 09/146, 827 号明細書及び同第 09/148, 236 号明細書 (1998 年 9 月 4 日出願); Hesselger ら、J. Biol. Chem. 273 (25): 15687~15692 (1998); 及び Howard ら、J. Medicinal Chem. 41 (13): 2184~2193 (1998) に記載の化合物が挙げられる。

また、CCR-5 レセプターのアンタゴニストには、例えば特表 2002-543186 公報に記載のものが挙げられる。

本発明の医薬又は皮膚外用組成物は、例えば水溶液、油液、その他の溶液、乳液、クリーム、ゲル、懸濁液、マイクロカプセル、粉末、顆粒、カプセル、固形剤等の形態で適用される。従来から公知の方法でこれらの形態に調製したうえで、ローション製剤、乳液剤、クリーム剤、軟膏剤、硬膏剤、ハップ剤、エアゾール剤、水-油 2 層系、水-油-粉末 3 層系、注射剤、内服剤（錠剤、散剤、顆粒剤、丸剤、シロップ剤、トローチ剤等）、坐剤等として、身体に塗布、貼付、噴霧、注射、飲用、挿入することができる。当該組成物は上記インヒビターを皮膚しみ形成抑制因子及び／又は皮膚しみ除去因子として、特に限定することなく、組成物全量に基づき例えば 0.001 mM~1 M、好ましくは 0.01~100 mM、より好ましくは 0.1~10 mM 程度含有するであろう。

これらの剤型の中でも、ローション製剤、乳液剤、クリーム剤、軟膏剤、硬膏剤、ハップ剤、エアゾール剤等の皮膚外用剤が、本発明の目的に適する剤型である。なお、ここで記す皮膚外用剤には、医薬品、医薬部外品（軟膏剤等）、化粧品〔洗顔料、乳液、クリー

ム、ジェル、エッセンス（美容液）、パック・マスク等の基礎化粧品；ファンデーション、口紅等のメーキャップ化粧品；口腔化粧品、芳香化粧品、毛髪化粧品、ボディ化粧品等]が含まれる。特に本発明の医薬又は皮膚外用組成物は、しみ予防の化粧料としての適用が好適である。

本発明の医薬又は皮膚外用組成物においては、所望する剤型に応じて従来公知の賦形剤や香料等をはじめ、油脂類、界面活性剤、防腐剤、金属イオン封鎖剤、水溶性高分子、増粘剤、顔料等の粉末成分、紫外線防御剤、保湿剤、酸化防止剤、pH調整剤、洗浄剤、乾燥剤、乳化剤等が適宜配合される。さらにこの他の薬効成分を本発明の医薬又は皮膚外用組成物に配合することは、その配合により所期の効果を損なわない範囲内で可能である。

皮膚しみ形成抑制因子及び／又は皮膚しみ除去因子をスクリーニングする方法

本発明はさらに、皮膚しみ形成抑制因子及び／又は皮膚しみ除去因子をスクリーニングする方法も提供する。この方法は、候補化合物を表皮中の上記遺伝子、例えばMCP-2の発現及び／もしくは活性を抑える、又はヒトFLJ21763遺伝子、マウスAKO12157遺伝子もしくはラットS74257遺伝子に対し高ストリンジェント条件下でハイブリダイゼーション可能なポリヌクレオチドの発現を抑える能力について評価し、当該阻害能力を有するインヒビターを皮膚しみ形成抑制因子及び／又は皮膚しみ除去因子として選定することを特徴とする。

好適な態様において、上記スクリーニング方法は更に、上記阻害能力を有するインヒビターをしみモデル動物に適用し、皮膚しみ形成抑制及び／又は皮膚しみ除去効果を有するインヒビターを選定することを含んで成る。

上記インヒビターの皮膚しみ形成抑制及び／又は皮膚しみ除去効果についての確認する工程はこのインヒビターをしみモデル動物、例えばしみモデルマウスを利用して実施することができる。動物としてはマウスの他にラット、ウサギなど様々な動物が利用できる。好適な態様においては、このインヒビターの溶液、例えば水溶液を調製してから皮膚しみモデル動物の皮膚に繰り返し塗布し、しみの形成を評価することで、上記効果の有無を判定することができる。

以下、具体例を挙げて、本発明を更に具体的に説明する。なお、本発明はこれにより限定されるものではない。

## 実施例

### しみモデルマウスの作製

しみモデルマウスはM. Naganuma et al., 前掲に記載の通りにして作製した。簡単には、7週齢のマウスに紫外光源(Toshiba FL-SE; UVB)の下で8週にわたり週3回、99mJ/cm<sup>2</sup>の強度で紫外線照射した(UV照射期)。週齢15～23週(UV照射期が終了して約8週まで)の間に脱色期を迎え、週齢23～35週(UV照射期が終了して約18～30週後)の間に色素斑出現期を迎え、週齢35～52週(UV照射期が終了して約30～47週後)の間に色素斑形成期を迎えた。

### 皮膚からのRNA採取

マウス背部の皮膚全層を採取、脂肪層を取り除き、加熱により表皮を剥離し、表皮をISOGEN(日本ジーン社、メーカー推奨プロトコル)によりRNAを抽出、RNeasy(Qiagen社)により精製した。真皮の方は、1センチ角に切断して液体窒素で凍結し破碎後、ISOGEN(日本ジーン社、メーカー推奨プロトコル)によりRNAを抽出、RNeasy(Qiagen社)により精製した。RNAはTBEアガロースゲルで泳動し、SYBR green(Molecular probes社)で染色して品質、精製度を確

認した。

UV照射期の試料は週齢約10週目にマウスから採取し、この試料に対するコントロールは週齢約14週目のマウスから採取した。脱色期の試料は週齢約20週目にマウスから採取し、この試料に対するコントロールも週齢約20週目のマウスから採取した。色素斑形成期の試料は週齢約42週目にマウスから採取し、この試料に対するコントロールは週齢約40週目のマウスから採取した。

#### マイクロアレイ用サンプルの反応

マイクロアレイ解析はアフィメトリックス社ジーンチップを用いた。

#### アフィメトリックス社用サンプル調製

アフィメトリックス社推奨プロトコルに準じて反応を行った。RNA 10  $\mu$ gをoligo-dT プライマー(24mer)、100pmol (Sigma社)と共に70°Cで10分間反応させた。その後、5x第一鎖反応バッファー4  $\mu$ l, 0.1M DTT 2  $\mu$ l, 10mM dNTP ミックス 1  $\mu$ l, Superscript II 2  $\mu$ l (すべてInvitrogen社)を加えて、42°Cで1時間反応させた。この反応物に、Rnase非含有水91  $\mu$ l, 5x第二鎖反応バッファー30  $\mu$ l, 10mM dNTP ミックス3  $\mu$ l, 10U/ $\mu$ l E.coli DNA リガーゼ1  $\mu$ l, 10U/ $\mu$ l E.coli DNAポリメラーゼ I 4  $\mu$ l, 2U/ $\mu$ l Rnase H 1  $\mu$ l (すべてInvitrogen社)を加え、16°Cで2時間反応させた。さらに、2  $\mu$ l (10U/ $\mu$ l) のT4 DNA ポリメラーゼ (Invitrogen社)を加え、16°Cで5分間反応後、10  $\mu$ lの0.5M EDTAを加えて反応を止めた。Phase Lock Gels (Qiagen社)を用いクリーンアップを行い、Rnase 非含有水12  $\mu$ lに溶出した。得られたcDNAからin vitro 転写反応によりビオチン付加cRNAを作製し (Enzo, Farmingdale)、RNeasy (Qiagen社)により精製した。cRNAをフラグメンテーションバッファー中で94°Cにて35分間分断した後、ジーンチップハイブリ

ダイゼーションに用いた。チップ洗浄後、アフィメトリックス社スキャナーによりデータ読み取りを行った。

### 解析結果

約9,000種の遺伝子の発現を網羅的に解析した結果、しみモデルマウスの表皮において、コントロールマウスの表皮と比べ、AK012157遺伝子、MCP-2遺伝子及び遺伝子群(1)～(3)の遺伝子の発現が顕著に亢進されていることが見出された。興味深いことに、AK012157遺伝子、MCP-2遺伝子の発現の亢進はUV照射期にとどまらず、UV照射を終えることでUV照射による表皮の褐色が脱色し始める脱色期、更にはその後しみが出現し始め、しみが形成される色素斑形成期においても常に認められた。しみモデルマウスの表皮においてこれらの遺伝子の発現がしみができる前の脱色期においても亢進していることから、これら遺伝子を指標とすれば、しみが形成される前の脱色期においても将来しみが形成されることを予知できることとなる。以下の表1及び2にその結果を示す。

表 1

	各コントロールに対する変動率		
	UV照射期	脱色期	色素斑形成期
MCP-2	4.7	13.8	3.2
AK012157	5.3	5.5	6.4

(正常部位またはUV非照射部位を1としたときの発現比。  
UV照射期、脱色期はn=2、色素斑形成期はn=3の平均値。)

表 2

遺伝子名

シミ部位／非シミ部位 (n=4)

Mcp9	3.9
Mcp10	3.6
Isg15	4.1
Usp18	2.2
Oas12	4.1
Gbp2	3.3
Gtpi	3.2
Ifi47	2.8
Igtp	2.7
Tgtp	2.6
Spr2A	23.3
Krt2-6b	3.4
Cdk5rap2	12.4
Mef2C	4.8
Gsta4	3.0
Osf2	2.9
Tnc	2.9
Igfbp6	2.9
Ppicap	2.6
Mcp-6	1.8
Mm. 74656	2.9

RT-PCR

皮膚から採取したRNA各（シミ部位、非シミ部位の表皮又は真皮）1  $\mu$ gをオリゴ-dTプライマー(24mer) 100pmol (Sigma) と共に7

0℃で10分(総容量20 $\mu$ l)反応させた。その後、5x第一鎖反応バッファ 4 $\mu$ l, 0.1M DTT 2 $\mu$ l, 2.5mM dNTP ミックス 4 $\mu$ l, SuperscriptII 1 $\mu$ l (すべてinvitrogen) を加えて、42℃で1時間反応させた。最後に70℃で10分反応させて伸長させ、cDNAテンプレートを調製した。rTaq用10xバッファ 5 $\mu$ l, 25mM MgCl<sub>2</sub> 3 $\mu$ l, 2.0mM dNTP ミックス5 $\mu$ l, rTaq 0.5 $\mu$ l (すべてTOYOBO社), ddH<sub>2</sub>O 33.5 $\mu$ l, cDNAテンプレート各1 $\mu$ l、プライマー(下記配列参照)、センス及びアンチセンス各20mM 1 $\mu$ l (総容量50 $\mu$ l) をすべて加え、PCR反応〔94℃ 2分、(94℃ 30秒、55℃ 30秒、72℃ 1分)を30サイクル、72℃ 10分〕を行った。

#### MCP-2 プライマー配列

センス TTCTTTGCCTGCTGCTCATA (配列番号4)

アンチセンス GACAAGGATGAGAAAACACG (配列番号5)

#### AK012157 プライマー配列

センス ACTCCGGCTCCTTCACTATG (配列番号6)

アンチセンス CTTTGGAATGAGGACTTGGA (配列番号7)

最後に1.5%エチジウムブロマイド含有アガロースゲルにて電気泳動して約300bpのバンドを得た。この結果を図3に示す。図3から明らかとなおり、AK012157遺伝子及びMCP-2遺伝子は表皮のしみ部位において顕著に発現し、表皮の非しみ部位ではほとんど発現していないことが認められた。また、真皮においてはいずれも発現差がなかった。

#### in situ ハイブリダイゼーション (ISH)

マウス皮膚組織を10%中性ホルマリンで固定、パラフィン包埋後、常法にしたがって組織切片スライドを作成した。これをベントナ社HXシステム自動スライド処理機を使用してin situ ハイブリダイゼーション反応を行った(プロトコール: Japan open blue 8.0)。

前処理として組織切片をブロッキング、プロテアーゼ処理後、AK012157配列からT7ポリメラーゼを用いて作成したDigラベルリボプローブ500ngと、68℃にて6時間ハイブリダイゼーションさせた。その後洗浄してAnti-Dig-アルカリフォスファターゼを反応させ洗浄後、基質NBT/BCIPを用いて呈色させて封入、光学顕微鏡で観察した。

その結果を図4に示す。図4から明らかなとおり、AK012157遺伝子は表皮のしみ部位において顕著に発現し、表皮の非しみ部位ではほとんど発現していないことが認められた。

#### 免疫組織染色 (IHC)

マウス皮膚組織を中性ホルマリン固定、パラフィン包埋後、常法に従って組織切片を作成した。これを1%  $H_2O_2$  で15分処理後、30分ブロッキングし、1/50希釈の抗マウスMCP2抗体(R&D Systems)を1昼夜反応させた。これをチラミド増感法(TSAシステム、パーキンエルマー社)キットによって検出を行った。洗浄後、HRPつき二次抗体を反応させ洗浄、FITCラベルチラミドを反応させて洗浄、包埋し、蛍光顕微鏡で観察を行った。

その結果を図5に示す。図5から明らかなとおり、MCP-2遺伝子は表皮のしみ部位において顕著に発現し、表皮の非しみ部位ではほとんど発現していないことが認められた。

#### 主要なシグナル伝達系タンパク質群の発現比較

シミモデルマウスのシミ部位と正常部位の表皮タンパク質を抽出し、図6に示す主要なシグナルタンパク質群の発現量をウエスタンブロットにより調べたところ、リン酸化STAT1が特にシミ部位／正常部位で大きな発現差を示していた。この結果はインターフェロン誘導遺伝子群（遺伝子群（1））がシミ部位で亢進していることと整合性がある。



## 産業上の利用の可能性

本発明により、皮膚しみ形成を予知するための皮膚検査方法提供が可能となる。

## 請 求 の 範 囲

1. 皮膚しみ形成を予知するための皮膚検査方法であって、表皮中のM C P 2 (Monocyte Chemoattracting Protein 2: 単球化学誘引タンパク質-2) の発現が正常な表皮中の発現に比べて亢進している場合、しみ形成し易い皮膚であると判断することを特徴とする方法。

2. 前記皮膚しみ形成がU V B照射を原因とする、請求項1記載の方法。

3. 前記表皮中のM C P 2 の発現の亢進が、表皮中のM C P 2 の量を測定することにより決定される、請求項1又は2記載の方法。

4. 前記測定がM C P 2 に特異的な抗体を利用するELISA法又はRIA法による、請求項3記載の方法。

5. 前記表皮中のM C P 2 の発現の亢進が、表皮から抽出されたM C P 2 をコードするmRNAの量を測定することにより決定される、請求項1～4のいずれか1項記載の方法。

6. 前記mRNAの測定をポリメラーゼ連鎖反応法により行う、請求項5記載の方法。

7. 皮膚しみ形成抑制因子及び／又は皮膚しみ除去因子をスクリーニングする方法であって、候補化合物をM C P 2 の発現及び／又は活性を阻害する能力について評価し、当該阻害能力を有するM C P 2 インヒビターを皮膚しみ形成抑制因子及び／又は皮膚しみ除去因子として選定することを特徴とする方法。

8. 更に、前記阻害能力を有するM C P 2 インヒビターをしみ形成モデル動物に適用し、皮膚しみ形成抑制及び／又は皮膚しみ除去効果を有するインヒビターを選定することを含んで成る、請求項7記載の方法。

9. 皮膚しみ形成を予知するための皮膚検査方法であって、表皮中の配列番号2に示す塩基配列から成るポリヌクレオチド（ヒトFLJ21763遺伝子）もしくは当該ポリヌクレオチドに対し高ストリンジेंट条件下でハイブリダイゼーション可能なポリヌクレオチド、表皮中の配列番号1に示す塩基配列から成るポリヌクレオチド（マウスAK012157遺伝子）に対し高ストリンジेंट条件下でハイブリダイゼーション可能なポリヌクレオチド、又は表皮中の配列番号3に示す塩基配列から成るポリヌクレオチド（ラットS74257遺伝子）に対し高ストリンジेंट条件下でハイブリダイゼーション可能なポリヌクレオチドの発現が正常な表皮中の発現に比べて亢進している場合、しみ形成のし易い皮膚であると判断することを特徴とする方法。

10. 前記皮膚しみ形成がUVB照射を原因とする、請求項9記載の方法。

11. 前記表皮中の前記ポリヌクレオチドの発現の亢進が、表皮から抽出された前記当該ポリヌクレオチドに相補性のmRNAの量を測定することにより決定される、請求項9又は10記載の方法。

12. 皮膚しみ形成抑制因子及び／又は皮膚しみ除去因子をスクリーニングする方法であって、候補化合物を表皮中の配列番号2に示す塩基配列から成るポリヌクレオチド（ヒトFLJ21763遺伝子）もしくは当該ポリヌクレオチドに対し高ストリンジेंट条件下でハイブリダイゼーション可能なポリヌクレオチド、表皮中の配列番号1に示す塩基配列から成るポリヌクレオチド（マウスAK012157遺伝子）に対し高ストリンジेंट条件下でハイブリダイゼーション可能なポリヌクレオチド、又は表皮中の配列番号3に示す塩基配列から成るポリヌクレオチド（ラットS74257遺伝子）に対し高ストリンジेंट条件下でハイブリダイゼーション

可能なポリヌクレオチドの発現を阻害する能力について評価し、当該阻害能力を有するインヒビターを皮膚しみ形成抑制因子及び／又は皮膚しみ除去因子として選定することを特徴とする方法。

13. 更に、前記阻害能力を有する前記インヒビターをしみ形成モデル動物に適用し、皮膚しみ形成抑制及び／又は皮膚しみ除去効果を有するインヒビターを選定することを含んで成る、請求項12記載の方法。

14. 皮膚しみ形成を予知するための皮膚検査方法であって、M c p 9 (small inducible cytokine B subfamily (Cys-X-Cys), member 9)、M c p 10 (small inducible cytokine B subfamily (Cys-X-Cys), member 10)、I s g 15 (Interferon-stimulated protein (15kDa) isg15(Ubiquitin-like))、U s p 18 (ubiquitin specific protease 18)、O a s 12 (2'-5' oligoadenylate synthase-like OASL2 (IFN induced))、G b p 2 (IFN induced guanylate nucleotide binding protein 2 gbp2(antivirus))、G t p i (G T P a s e ; interferon-g induced GTPase(19440))、I f i 47 (interferon gamma inducible protein, 47kDa (GTP-binding motif))、I g t . p (G T P a s e ; interferon gamma induced GTPase igtp)) 及び T g t p (G T P a s e ; T-cell specific GTPase(IFN gamma)) から成る群から選ばれるタンパク質をコードする遺伝子の発現が正常な表皮中の発現に比べて亢進している場合、しみ形成し易い皮膚であると判断することを特徴とする方法。

15. 皮膚しみ形成を予知するための皮膚検査方法であって、S p r r 2 A (small proline-rich protein 2A)、K r t 2 - 6 b (keratin complex 2, basic, gene 6a)、C d k 5 r a p 2 (CKK 5 regulatory subunit associated protein 2)、M e f 2 C (myocyte enhancer factor 2C)、G s t a 4 (glutathione S-transfe

rase, alpha 4)、O s f 2 (osteoblast specific factor (fascilin I-like))、T n c (Tenascin C)、I g f b p 6 (insulin-like growth factor binding protein 6) 及び P p i c a p (peptidylprolyl isomerase C (cyclophylin C)-associated protein) から成る群から選ばれるタンパク質をコードする遺伝子の発現が正常な表皮中の発現に比べて亢進している場合、しみ形成し易い皮膚であると判断することを特徴とする方法。

16. 皮膚しみ形成を予知するための皮膚検査方法であって、M C P - 6 (Mast cell protease 6) タンパク質の発現が正常な表皮中の発現に比べて亢進している場合、しみ形成し易い皮膚であると判断することを特徴とする方法。

17. 前記皮膚しみ形成がU V B 照射を原因とする、請求項14～16のいずれか1項記載の方法。

18. 前記表皮中の前記遺伝子の発現の亢進が、表皮から抽出された前記タンパク質をコードするmRNAの量を測定することにより決定される、請求項14～17のいずれか1項記載の方法。

19. 皮膚しみ形成抑制因子及び／又は皮膚しみ除去因子をスクリーニングする方法であって、候補化合物を請求項14～16のいずれか1項に規定する遺伝子の発現及び／又は当該遺伝子のタンパク質産物の活性を阻害する能力について評価し、当該阻害能力を有するインヒビターを皮膚しみ形成抑制因子及び／又は皮膚しみ除去因子として選定することを特徴とする方法。

20. 更に、前記阻害能力を有するインヒビターをしみ形成モデル動物に適用し、皮膚しみ形成抑制及び／又は皮膚しみ除去効果を有するインヒビターを選定することを含んで成る、請求項19記載の方法。

21. 皮膚しみ形成を予知するための皮膚検査方法であって、表

皮中の配列番号 1 に示す塩基配列から成るポリヌクレオチド (Mm . 7 4 6 5 6) に対し高ストリンジェント条件下でハイブリダイゼーション可能なポリヌクレオチドの発現が正常な表皮中の発現に比べて亢進している場合、しみ形成のし易い皮膚であると判断することを特徴とする方法。

2 2 . 前記皮膚しみ形成が U V B 照射を原因とする、請求項 2 1 記載の方法。

2 3 . 前記表皮中の前記ポリヌクレオチドの発現の亢進が、表皮から抽出された前記当該ポリヌクレオチドに相補性の mRNA の量を測定することにより決定される、請求項 2 1 又は 2 2 記載の方法。

2 4 . 皮膚しみ形成抑制因子及び／又は皮膚しみ除去因子をスクリーニングする方法であって、候補化合物を表皮中の配列番号 1 に示す塩基配列から成るポリヌクレオチド (Mm . 7 4 6 5 6) に対し高ストリンジェント条件下でハイブリダイゼーション可能なポリヌクレオチドの発現を阻害する能力について評価し、当該阻害能力を有するインヒビターを皮膚しみ形成抑制因子及び／又は皮膚しみ除去因子として選定することを特徴とする方法。

2 5 . 更に、前記阻害能力を有する前記インヒビターをしみ形成モデル動物に適用し、皮膚しみ形成抑制及び／又は皮膚しみ除去効果を有するインヒビターを選定することを含んで成る、請求項 2 4 記載の方法。

Fig.1

Start  
\*\*\*

AK012157 1' AAACNNTTTTCGTGGCACAGCTTCCTCCCTAGG-CGTGAGACTCCGGCTCCTTCACTATGA  
 S74257 1" TTTTTTGTGCCACTGCTTCCTCTCTAGC-CGTGAGACTCCAGCTACTTCACTATGC  
 FLJ21763 1" GGAGGACTTCTGCAGCACAGCTCCCTTCCCAGGAGGTGAAAATCTGCCTTC-TCACCATGA  
 \*\* \*\*\* \*\*\* \*\*\* \* \*\* \*\*\*\*\* \* \*\* \* \* \*\*\*\* \*\*

AK012157 61' GACTTCTAGCCCTTTCCGGTCTGCTCTGCATGCTGCTCCTCTGTTTCTGCATTTTCTCCT  
 S74257 57" GACTTCTCACCCTCTCCGGTTTGTTCCTCATGCTGTTCCCTCTGTCTCTGCGTTCTCTCCT  
 FLJ21763 120" GGCTTCTAGTCCTTTCCAGCCTGCTCTGTATCCTGCTTCTGCTTCTCCATCTTCTCCA  
 \* \*\*\*\*\* \*\*\* \*\*\* \* \*\* \*\*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\* \* \*\*\*\*\*  
 | intron start

AK012157 121' CAGAAGGGAGAAGACATCCTGCCAAGTCCTTGAAACTCA-----GGCGCTGCTGTCA  
 S74257 117" CAGAAGGGAGAAAGCGTCCTGCCAAGTCCCGAAACTCA-----GGCCCTGCTGTCA  
 FLJ21763 180" CAGAAGGGGAAGAGGCGTCCTGCCAAGGCCTGGTCAGGCAGGAGAACCAGGCTCTGCTGCCA  
 \*\*\*\*\* \* \* \*\*\*\*\* \* \* \* \* \*-----\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*  
 | intron start

AK012157 181' CCTATCTCCTAGATCCAAGCTGACAACCTGGAAAGGAAACCACACAAGGCCCTGCAGACT  
 S74257 176" TCTATCTCCTAGATCCAACCAATAACCTGGAAAGGAAACCACACAAGACCCTGCAGACC  
 FLJ21763 240" CCGAGTCCCTAGCCCCAACTCAACAAACCTGAAAGGACATCATGTGAGGCTCTGTAAACC  
 \* \* \*\*\*\*\* \*\*\* \* \*\* \* \*\*\*\*\* \* \*\* \* \* \*\*\*\* \* \*\*

stop  
\*

AK012157 241' CTGCAGAAACAAGCTACCAGTCAAGTCAT-GGGTGGTGCCTGGGGCTCTCCACAGATAT  
 S74257 235" ATGCAGAAA-GCTAGAATCCAATTCAT-GGGTGGTGCCTGGGGCTCTCCACAGATAT  
 FLJ21763 300" ATGCAAGCTTGAGCC-AGAGCCCCGCCCTTTGGGTGGTGCCTGGGGCACTCCACAGGTGT  
 \*\*\*\* \*\* \* \* \* \* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \* \*

\*\*

AK012157 299' AGGGCCT-----CCTCCGCCCAGA-----TGA-AGCGTTG-----ATGCCAG-  
 S74257 292" AGGGCCTCCCGAAGCTGGCCTCCACCGAGA-----TGA-AACGTTG-----ATGTCCAG-  
 FLJ21763 359" AG-CACT-----CCCAAAGCAAGACTCCAGACAGCGGAGAACCTCATGCCTGGC  
 \*\* \*\* \*\* \* \*\*\*-----\*\*\* \*\* \*-----\*\*\* \* \*-

## Fig. 2

AK012157 349' ATGTGGAGACACCAGAAGCATACACACTATGTTGCCTTGCCCTTGCCAATGAGCTGTGA  
 S74257 349" TTATGGAGACA--ACCTTC-TGGCCCCTA-CCAACCTT---CATGCCAGAAAGCTGTGA  
 FLJ21763 418" ACCTGAGGTACCCAGCAGCCTCCTGTCTCCCTTTTCAGCCTTCACAGCAGTGAGCTGCAA  
 \*\* \* \* \* \* \*\* \*\* \*\*\*\*\* \*

AK012157 409' CACTGGAATGCTTCACTTCAGACATC-AGGGCGGATGG---ATTGCAGAATTCGAAGTCTCATTCCAAAG  
 S74257 405" CACCAGAATGTTTCACTTCAGAC-----AGCTGGAAGG---ATTACAGAATTCGAAGCCTCGTTCCAAAG  
 FLJ21763 478" TGTGGAGGGCTTCATCTCGGGCTGCAAGGACCCTGGGAAAGTTCAGAACTCCACGTCTTGTCTCAATT  
 \*\* \* \*\*\*\*\* \*\* \* \* \* \* \*\*--- \*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \* \*\*\* \* \*\*\*

AK012157 469' GTGTCAACCAACCTTCAGAGTCACCTAAGGTCCAGGGTCAGCC-CACAAGTCACCATGGCTC  
 S74257 460" GTGCAACCAACCTTCAGAGTCACCTATGATCCAGGGTCAGCC-CACAAGTCTTCATGGCTC  
 FLJ21763 538" GTGCCATCAACTTTTCAGAGCTATCATGAGCCAACCTCAGCCTTCGAGTAGCTGGGATTA  
 \*\*\* \* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \* \* \* \* \*\*\* \*\*\*\*\*- \* \*\*\* \* \*

AK012157 529' CTCCAGAGTAAAAGTCCAAGATTCCACCTGTGGGAGCTACAGATCCAGAGACTTTCAAGC  
 S74257 520" CTGCAGAGTAAAAGTCCAAGATTCCATCCCTGGGAGCTACAGATTACAGAGACTTCAAGC  
 FLJ21763 598" CAGGTGTGCGCCACCACCCCGGCTAATTTTTGCTTTTTTTTTTTTGGAGACAGAATCTC  
 \* \* \* \* \* \*\* \* \* \* \* \* \* \* \*\*\*\*\* \*

AK012157 589' TGACTAGAGTGACAGAGAAG-CAAGACCTCAGTGTGATCAGCCGAGACTACAGCATCTTGG  
 S74257 580" TGACTGGCGAACAGAGTAG-CAAGACTTCCTTGTGATCAGATGAGATTACAGCATCTTAG  
 FLJ21763 658" GCTCTGTTGCTCAGGCTGGAGTGGAGTGCAGTGGCAGATCTCAGCTCACTGCAGCCTCT  
 \*\* \* \*\*\* \*- \*\* \* \* \* \* \* \* \*\* \*\* \*\*\*\*\* \*

AK012157 649' GAACCCTCAGTCAGCCCCAAACCCCTAACCTTAACCAGTGGTCTCAAACCAACACCTG  
 S74257 640" GAACCCTCGGACACCCCAAACCCATAGCATTTAATCAACGGGATATGAACCAACTCCTG  
 FLJ21763 718" G---CCTCCCGGGTTTCAGGAGATTCTCCTGACTCAACCTCCTGAGTAGCTGGGATTACAGG  
 \* \*\* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

AK012157 709' TAACTTCCTAATGAAATCATCAGGAGGATACCAAAAGAAATAAACCATAAATCAGCATACACAG  
 S74257 700" TAACTTCCTAATGTAATCACCAGGAGAACACCAAAATAATAAATCATAAATCAATGT  
 FLJ21763 776" TGCCTGCCACTATGCCTAGCTAATTTTTGTATTTTGTAGTGGAGACGGGGTTTTGCCGTGTTGGCC  
 \* \*\* \*\* \* \* \* \* \* \* \* \*

GGGGTGGTCTCGAACTCCTGACCTCAAGTGATCCACCCGCATCGGCCCCCAAAG



Fig.3

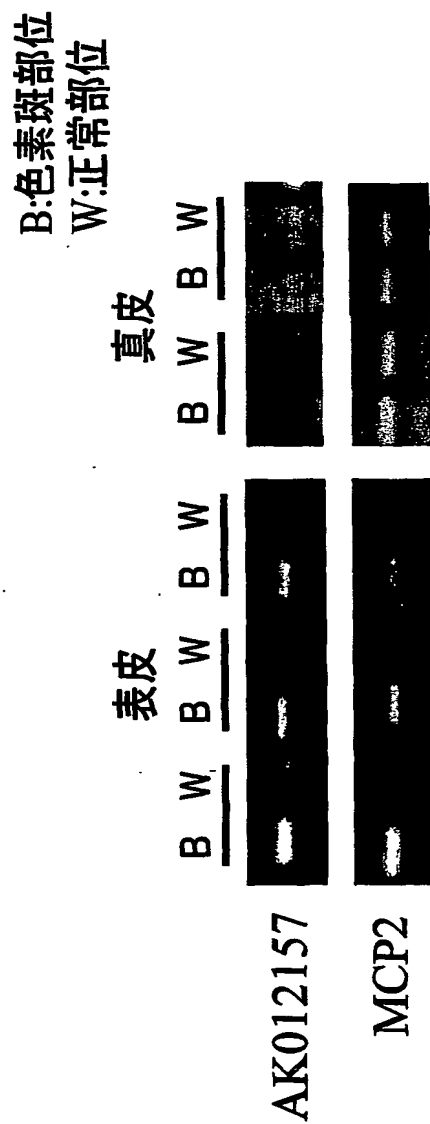


Fig.4

(紫色 : AK012157 発現部位、茶色 : メラニン)

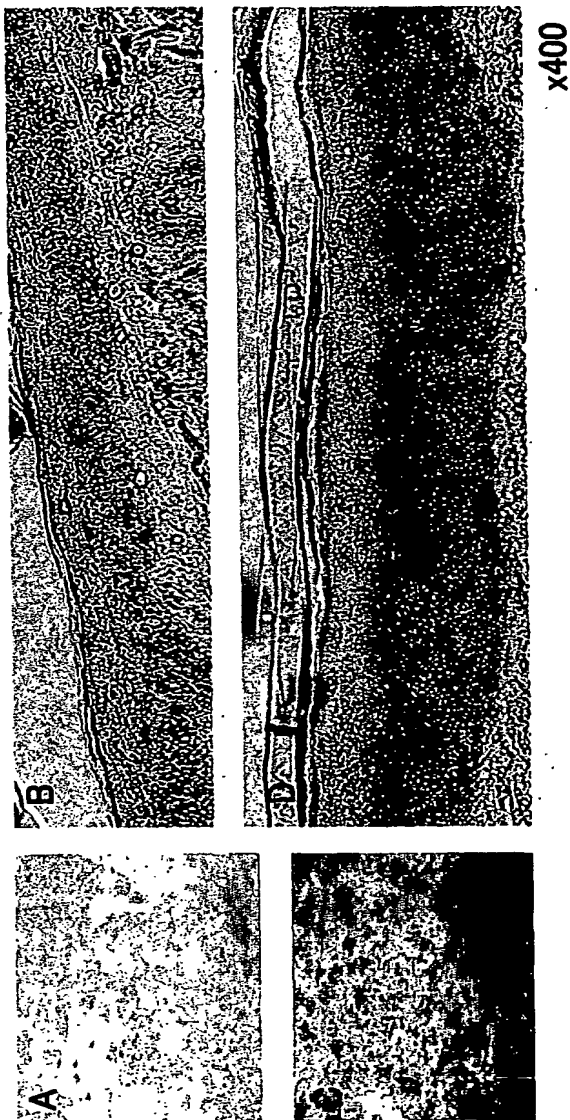


Fig. 5

(緑蛍光:MCP-2発現部位)

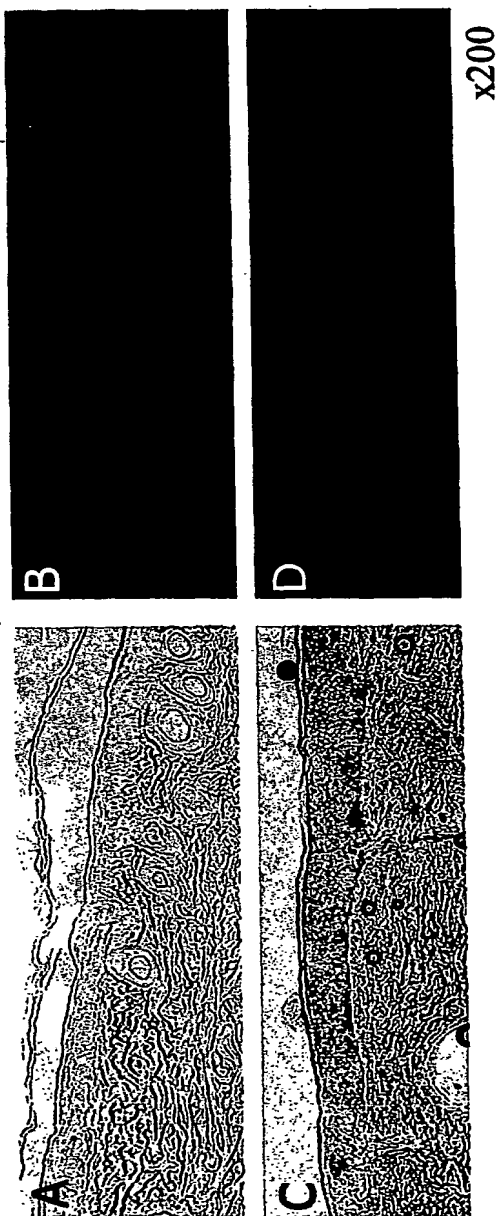
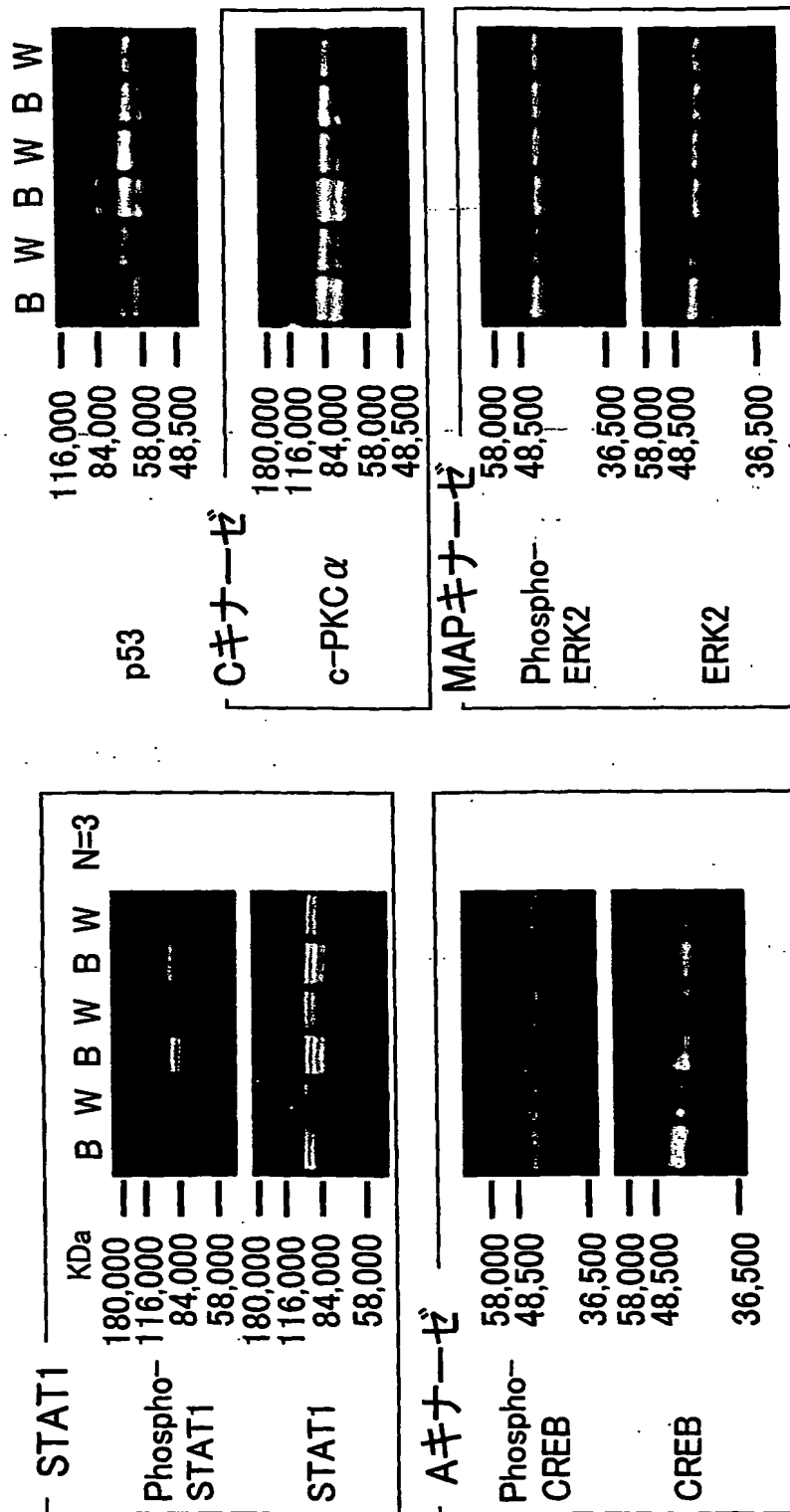


Fig. 6

B: 色素斑部位  
W: 正常部位



## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Shiseido Co. Ltd.

&lt;120&gt; Methods for Predicting Skin Stain Formation and for Screening Agent Capable of Inhibiting Skin Stain Formation By Means of Promoted Genes in Sustained Regions as an Indicator

&lt;130&gt; P871

&lt;150&gt; JP 2003-343549

&lt;151&gt; 2003-10-01

&lt;150&gt; JP 2003-344786

&lt;151&gt; 2003-10-02

&lt;160&gt; 7

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 758

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mouse

&lt;400&gt; 1

aaacnntttt cgtggcacag cttcctccct aggcgtgaga ctccggctcc ttcactatga	60
gacttctagc cttttccggt ctgctctgca tgctgctcct ctgtttctgc attttctcct	120
cagaagggag aagacatcct gccaaagtcct tgaaactcag gcgctgctgt cacctatctc	180
ctagatccaa gctgacaacc tggaaaggaa accacacaag gccctgcaga ctctgcagaa	240
acaagctacc agtcaagtca tgggtggtgc ctggggctct cccacagata tagggcctcc	300
tccgcccaga tgaagcggtg atgcccagat gtggagacac cagaagcata cacactatgt	360
tgccttgccc cttgccaatg agctgtgaca ctggaatgct tcacttcaga catcagggcg	420
gatggattgc agaattccaa gtcctcattc caaagggtgc accaaccttc agagtcacta	480
aggtccaggc tcagcccaca agtcaccatg gtcctccag agtaaaagtc caagattcca	540
cctgtgggag ctacagatcc agagactttc aagctgacta gagtgcagag aagcaagacc	600
tcagtgtgat cagccgagac tacagcatct tgggaaccct cagtcagccc caaaccctta	660
acacttaacc actggtctcc aaaccaacac ctgtaacttc ctaatgaaat catcaggagg	720
ataccaaaag aaataaacca taaatcagca tacacacg	758

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 2063

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo Sapiens

&lt;400&gt; 2

ctctgccc	at	tgggaaac	ac	ctctctat	ga	ctctataa	at	gtccaagg	tg	gccccaa	agg	60						
aggacttc	tg	cagcacag	ct	cccttccc	ag	gacgtgaa	aa	tctgcctt	ct	caccatga	agg	120						
cttctagt	cc	tttccagc	ct	gctctgtat	c	ctgcttct	ct	gcttctcc	at	cttctcca	a	180						
gaaggga	a	ggcgctct	gc	caaggcct	gg	tcaggcag	ga	gaaccagg	ct	tgctgcc	ac	240						
cgagtc	cc	ta	gccccaa	actc	aacaaac	ctg	aaaggaca	tc	atgtgagg	ct	gttaa	acca	300					
tgcaag	ct	tg	agccagag	cc	ccgccttt	gg	gtggtgc	ctg	gggcact	ccc	acagg	gt	tag	360				
cactcccc	aaa	gcaagact	cc	agacagcg	ga	gaacctca	tg	cctggcac	ct	gaggtac	cca	420						
gcagcc	tc	ct	gtctcccc	tt	tcagcc	ttca	cagcagt	gag	ctgcaat	gtt	ggagg	g	cttc	480				
atctcg	gg	ct	gcaaggac	ccc	tgggaa	agt	tt	ccagaac	tc	acgtc	ctt	gt	ctcaat	gtg	540			
ccatca	act	t	tcagag	ctat	catgag	ccaa	cctcag	cc	tt	ccgag	tag	ct	gggatt	acag	600			
gtgtgc	gcca	ccacacc	cg	ctaatt	tttt	tg	cttttt	tttt	ttt	tgag	aca	gaat	ctc	gct	660			
ctgttg	ctca	ggctgg	agt	g	agtgc	agt	gcacgat	ctc	agctc	act	gc	agc	ct	ctg	cc	720		
tcccgg	gttc	aggagatt	ct	cctgact	caa	cctcct	gagt	agctgg	gatt	acagg	tg	cc	ct	ct	ct	780		
gccact	atgc	ctagcta	aatt	tttgtat	ttt	tagtgg	agac	gggg	tttt	gc	cgtgtt	gg	cc	840				
gggg	tggt	ct	cgaact	cctg	acctca	agt	g	atccacc	gc	atcgg	cccc	caa	agt	g	ctg	900		
ggattat	agg	cgtga	acc	ac	cg	cctg	tc	ccattg	ttgt	gtaatt	ttta	taatt	ag	ttt	960			
tttaag	tact	tgatttt	atg	ggcacat	ttt	tgtggg	atga	ttggag	ttaa	tcaa	ataa	ag	1020					
cttg	catgt	gtgtag	tttg	gtaagata	ac	ttcttta	aat	tcatg	tttt	ct	gc	ctt	ga	1080				
ggtag	tgagg	gaaagat	ctt	aatcagt	att	ttggta	atta	actgat	tgaa	ttca	ag	caaa	1140					
tgagac	atca	tgaact	tcag	tggttat	tga	tatttc	agg	tata	acctg	aaat	gc	ctag	1200					
aggata	caga	tttct	cattt	cattct	tttg	tcttt	cattt	ctctat	atac	agaa	at	gaaa	1260					
tgacac	ttct	gggagg	cagt	agaagc	agga	agtcaat	gaa	ttgag	tagag	ggtccc	attc	1320						
cctcag	gctg	tcattg	atca	gtgaca	attt	ataaaa	acaa	actg	caa	agt	ctgt	gg	caag	1380				
tggctg	cctg	cttc	ctagaa	ggagccc	atg	aagg	ttaa	ac	tctgt	gg	tcg	gtatt	tg	caa	1440			
gcgccg	ggcg	tgg	tggtgc	tc	cg	cctg	ta	at	cctag	cac	ct	tggg	agg	cca	aggcag	gcg	1500	
atcacc	cgag	gtcagg	agt	t	gaggat	ttg	caag	caaa	ag	gtc	ct	ct	cct	gag	t	cttt	cc	1560
cagata	ccca	gcagt	gcaga	ggctag	ctgt	ggaagg	ttgc	agtggg	acag	gaat	gtat	tg	1620					
tatgc	cttgc	cttact	tg	tc	accatt	gaga	tttcc	agaga	aatggg	cata	acgt	ct	ct	ta	1680			
acaaca	acag	cagaa	ag	caa	aata	catt	aa	ctta	agg	ttg	aca	acaaa	ag	attat	ca	agt	1740	
accatg	tttt	ccaac	caacc	agttat	tcgt	ggta	ata	ata	aa	agg	t	ggg	aaa	at	gt	1800		
tataa	tttt	aagg	aa	actg	tgtact	tt	aa	aat	ctt	ctt	tatga	aat	atc	caat	gtt	act	1860	
gtaat	cctgc	tccatt	aa	at	gcag	catt	gt	tgtc	agg	tg	tc	cct	ctt	gc	ttgg	ga	acag	1920
cattgg	gctt	ttaa	at	gt	ct	gcaga	at	ctc	tgcg	tt	cgaa	ggga	at	igag	aatga	act	ctc	1980
ctggt	actgt	aatga	aa	ata	aggt	ct	g	ctc	aac	acag	ta	acgt	tt	c	ct	ct	ttta	2040

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa

2063

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 742

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Rat

&lt;400&gt; 3

tttttttg	ccactgcttc	ctctctagcc	gtgagactcc	agctacttca	ctatgcgact	60
tctcaccctc	tccggtttgt	tcttcattgt	gttcctctgt	ctctgcgttc	tctcctcaga	120
aggagaaaag	cgtcctgcca	agttcccgaa	actcaggcct	gctgtcatct	atctcctaga	180
tccaaaccaa	taactggaaa	ggaaaccaca	caagaccctg	cagaccatgc	agaaagctag	240
aatccaattc	atgggggtgt	gcctggggct	ctccacacaga	tatagggcct	cccgaagctg	300
gcctccaccg	agatgaaacg	ttgatgtcca	gttatggaga	caaccttctg	gccctacca	360
accttcattg	ccagaaagct	gtgacaccag	aatgtttcac	ttcagacagc	tgaaggatta	420
cagaattcca	agccctcggt	caaagggtgc	aaccaacctt	cagagtcact	atgatccagg	480
gtcagcccac	aagtcttcat	ggctcctgca	gagtaaaagt	ccaagattcc	atccctggga	540
gctacagatt	cagagacttc	caagctgact	ggcgaacaga	gtagcaagac	ttccttgtga	600
tcagatgaga	ttacagcatc	ttaggaaccc	tcggacaccc	ccaaacccat	agcatttaat	660
caacgggata	tgaaccaact	cctgtaactt	cctaattgtaa	tcaccaggag	aacacaaaaa	720
ataataaatc	ataaatcaat	gt				742

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;223&gt; Sense Primer

&lt;400&gt; 4

ttctttgcct	gctgctcata	20
------------	------------	----

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;223&gt; Antisense Primer

&lt;400&gt; 5

gacaaggatg	agaaaacacg	20
------------	------------	----

<210> 6  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<223> Sense Primer  
<400> 6  
actccggctc cttcactatg 20  
<210> 7  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<223> Antisense Primer  
<400> 7  
ctttggaatg aggacttgga 20



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP2004/014799

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> G01N33/68, C12Q1/68, G01N33/50, G01N33/15

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> G01N33/48-98, C12Q1/68, G01N33/15

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2004
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2004	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2004

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST (JOIS), CA (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2003-245097 A (Unilever N.V.), 02 September, 2003 (02.09.03), Claims; Par. Nos. [0007], [0008], [0033], [0053] & US 2003/0170739 A	1-8
A	WO 2002/043758 A (Schering Corp., USA), 06 June, 2002 (06.06.02), & JP 2004-517078 A & US 2002/0111290 A & EP 1399184 A	1-8
P, A	JP 2004-205246 A (Kanebo, Ltd.), 22 July, 2004 (22.07.04), Claims (Family: none)	1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
01 November, 2004 (01.11.04)

Date of mailing of the international search report  
18 January, 2005 (18.01.05)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/014799

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2003-271728 A (Shiseido Co., Ltd.), 26 September, 2003 (26.09.03), (Family: none)	1-8

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/014799

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:  
(See extra sheet.)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
Claims 1 to 8.

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/014799

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet (2)

The only one matter common to MCP2 as set forth in claim 1, the polynucleotides represented by SEQ ID NOS:1 to 3 as set forth in claim 9, 10 individual proteins as set forth in claim 14, 9 individual proteins as set forth in claim 15, MCP-6 as set forth in claim 16 and the polynucleotide Mm.74656 as set forth in claim 21 resides in the expression thereof being accelerated specifically in the epidermis at a spot site in a model animal of spot formation.

However, it has been publicly known that, when the gene expression amount in the skin damaged by sunlight is compared with the gene expression amount in the skin protected from sunlight, a gene showing a change in the transcriptional production level is expressed in the epidermis after the exposure to sunlight (see, in particular, EXAMPLE 1 in JP 2003-245097 A). It was also well known at the point of the application of the present case that spots are formed on the skin as one of damages caused by sunlight (see, if necessary, JP 8-165231 A [0002] and JP 6-263623 A [0002]). Accordingly, the fact "the expression being accelerated specifically in the epidermis at a spot site in a model animal of spot formation" cannot be considered as a special technical feature in the meaning within the second sentence of PCT Rule 13.2. There is no other common matter seemingly being a special technical feature in the meaning within the second sentence of PCT Rule 13.2 among the inventions relating to the substances as described above.

Such being the case, these inventions are not considered as a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> G01N33/68, C12Q1/68, G01N33/50, G01N33/15

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> G01N33/48-98, C12Q1/68, G01N33/15

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2004年
日本国登録実用新案公報	1994-2004年
日本国実用新案登録公報	1996-2004年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
JICST (JOIS), CA (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 2003-245097 A (ユニリーバ・ナムローゼ・ベンノートシャー プ) 2003.09.02 特許請求の範囲、【0007】、【0008】、 【0033】、【0053】 & US 2003/0170739 A	1-8
A	WO 2002/043758 A (Schering Corporation, USA) 2002.06.06 & JP 2004-517078 A & US 2002/0111290 A & EP 1399184 A	1-8

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献  
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

01.11.2004

国際調査報告の発送日

18.1.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)  
郵便番号 100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

山村 祥子

2J

9217

電話番号 03-3581-1101 内線 3251

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PA	JP 2004-205246 A (カネボウ株式会社) 2004. 07. 22 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-8
A	JP 2003-271728 A (株式会社資生堂) 2003. 09. 26 (ファミリーなし)	1-8

## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。  
別紙参照。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲1-8

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

## 第III欄の続き

請求項1に記載されたMCP2、請求項9に記載された配列番号1-3に示すポリヌクレオチド、請求項14に記載された10個のそれぞれのタンパク質、請求項15に記載された9個のそれぞれのタンパク質、請求項16に記載されたMCP-6、請求項21に記載されたポリヌクレオチドMm. 74656は、しみ形成モデル動物のしみ部位の表皮において発現が特異的に亢進されているという点でのみ共通する。

しかしながら、日光により障害を受けた皮膚と日光から保護された皮膚における遺伝子の発現量を比較すること、日光への暴露後、表皮において転写産物レベルが変化した遺伝子が発現されることは公知である（JP 2003-245097 A、特に実施例1を参照）。また、日光障害の一つとして皮膚におけるしみの発生は、本願出願時周知である（必要であれば、JP 8-165231 A【0002】、JP 6-263623 A【0002】を参照）。してみれば、「しみ形成モデル動物のしみ部位の表皮において発現が特異的に亢進している」ことは、PCT規則13.2の第2文の意味において特別な技術的特徴ではない。そして、上記物質に関する発明の間には、PCT規則13.2の第2文の意味において特別な技術的特徴と考えられる他の共通の事項は存在しない。

よって、これらの発明は単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとはいえない。



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**